小麦几种主要次生物质对麦长管蚜几种酶活力的影响

陈巨莲，倪汉祥，孙京瑞，程登发
（中国农业科学院植物保护研究所，北京 100094）

摘要：借助麦蚜人工饲料研究明确了小麦几种主要次生物质单宁酸、总酚（没食子酸）和香豆素对麦长管蚜 *Sitobion avenae* 的存活、生长和发育有明显的抑制作用，其抗蚜阈值浓度分别为0.06%、0.08%和0.065%。用昆虫酶系体外抑制法，研究上述三种次生物质的抗蚜阈值浓度对麦长管蚜的糖转化酶和解毒酶活力的影响，结果表明：0.06%单宁酸强烈抑制麦长管蚜蔗糖酶、海藻糖酶、羧酸酯酶和谷胱甘肽S-转移酶的活力；0.08%没食子酸显著抑制蔗糖酶、羧酸酯酶和谷胱甘肽S-转移酶的活力；0.065%香豆素极显著地抑制谷胱甘肽S-转移酶活力。

关键词：麦长管蚜；糖转化酶；解毒酶；次生物质；抗蚜性
中图分类号：Q965 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296（2003）02-0144-06

Effects of major secondary chemicals of wheat plants on enzyme activity in *Sitobion avenae*

CHEN Ju-Lian，NI Han-Xiang，SUN Jing-Rui，CHENG Deng-Fa（Institute of Plant Protection，Chinese Academy of Agricultural Sciences，Beijing 100094，China）

Abstract: The anti-herbivore effects of major secondary substances of wheat（*Triticum aestivum* L.），including tannic acid，total phenolic compound and coumarin，on the grain aphid，*Sitobion avenae*，were investigated by adding them to a chemically defined diet. The impact of these secondary chemicals on the activity of amylase，invertase，trehalase，esterase（CarE）and glutathione S-transferase（GST）in grain aphids was measured *in vitro*. The results show that tannic acid，total phenolic compound and coumarin significantly decreased nymphal survival，development and weight gain，with their resistant threshold concentrations being 0.06%，0.08% and 0.065%，respectively. At these concentrations，tannic acid strongly inhibited the activity of invertase，trehalase，CarE and GST and gallic acid（total phenolic chemicals）greatly decreased the activity of invertase，CarE and GST. However，coumarin only strongly inhibited GST activity.

Key words: *Sitobion avenae*；sugar invert enzymes；detoxification enzymes；secondary substances；anti-herbivore effect

小麦植株中存在多种主要次生物质（陈巨莲等，1997；Ding *et al*.，2000；刘保川等，2002），它们对麦长管蚜 *Sitobion avenae* 的生长发育、存活等具有很强的抑制作用（陈巨莲等，2002）。对蚜虫取食刺探电位EPG的研究表明，单宁酸、没食子酸抑制麦长管蚜的取食（另文发表）。但次生物质对该蚜虫糖转化酶的影响还未见报道。

植物次生物质常导致害虫水解酶和其它解毒酶活性降低（Waller，1987；罗万春和慕卫，1998），这可能是植物次生物质抗虫性原因之一。研究较多的解毒酶有羧酸酯酶、谷胱甘肽S-转移酶（GST）和多功能单加氧酶（PSMOs）。Zhang 等（1997）比较了41种植物多酚对离体谷胱甘肽还原酶（GSH-RD）的抑制作用，发现它们的抑制强度有明显差异：查尔酮＞单宁酸＞黄酮类化合物＞香豆素＞儿茶素。Leszczynski 和 Dixon（1992）证明丁布能降低麦长管蚜GST活力。罗万春和慕卫（1998）采用体内和体外试验研究发现金雀花碱和苦豆碱对小菜蛾的羧酸酯酶有明显的抑制作用。此外，植物次生物质还对昆虫的解毒酶系产生诱导作用。解毒酶系的变异是昆虫取食适应性的最重要的形式之一（Lindroth，1989）。在高抗小麦品种上饲养多代可诱导

基金项目：国家重点基础研究发展规划“973”项目（G200001621110）
作者简介：陈巨莲，女，1965年9月生，湖南新邵人，博士，副研究员，主要从事小麦抗虫机理、小麦与麦蚜互作关系以及昆虫分子生物学方面的研究，E-mail：chenjl@95777.com
收稿日期 Received：2001-11-12；接受日期 Accepted：2002-10-29

麦长管蚜多功能氧化酶（Raul *et al*.，2000）、麦长管蚜和禾谷缢管蚜的 GST（Leszczynski and Dixon，1994）酶活力提高。有关小麦主要抗虫次生物质对麦蚜解毒酶的直接抑制作用研究报道尚少。

植物次生物质通常贮存在液泡和表皮细胞等外部组织中（Mentink *et al*.，1984），韧皮部也有分布（Raven，1983）。许多植物次生物质从蚜虫或其它吸食韧皮部汁液的同翅目昆虫的蜜露或腹管分泌物中可检测到（Dreyer *et al*.，1985；Molyneux *et al*.，1990），表明蚜虫在取食时确实吸入一些与抗蚜相关的次生物质。

我们采用在麦蚜的酶粗提液反应体系中加次生物质至抗蚜阈值浓度的体外抑制测定法，研究其对蚜虫糖转化酶和解毒酶活力的影响，以便探明次生物质抗蚜的生理生化机制，为更好地利用小麦自身的防御机制、提高对麦蚜的自然控制作用提供理论依据。

1　材料和方法

1.1　酶液制备

取 500～1 000 头 3 龄以上的无翅蚜，加入 5～10 mL 预冷的相应酶缓冲液，在冰浴中匀浆，匀浆液在 12 000 r/min 下离心 15 min，取上清液作为酶液，并测定蛋白含量，反应体系中酶量为 20～50 μg 蛋白含量。

1.2　几种次生物质抗蚜性的生物测定

单宁酸、儿茶素（Sigma 公司）；总酚（用没食子酸代替）（中国医药公司）；香豆素（Fluka 公司）；芸香苷、槲皮素（由武予清博士提供）；丁布和门布（由王振营博士提供）。在人工饲料中加入不同量的次生物质，配成相应的浓度，即：总酚（即没食子酸）和儿茶素在 0.015%～0.095% 之间设 8 个浓度，单宁酸在 0.015%～0.060%之间设 5 个浓度，其余几种次生物质均在 0.035%～0.095%之间设 5 个浓度。麦长管蚜的人工饲料及饲养方法见陈巨莲等（2000），以存活率、死亡率、蜕皮指数［∑（当天查得蜕数/前一天活虫数）］及若蚜增重作为抗性评价指标，用 Duncan 新复极差法作统计分析，确定抗麦长管蚜主要次生物质种类；再以上述参数为因子，对同一种次生物质不同浓度进行聚类分析确定各种次生物质的抗蚜阈值。

1.3　次生物质贮液配制

0.3%单宁酸（水溶），0.42%没食子酸（水溶），0.36%香豆素（醇溶），以不加次生物质的酶反应体系作对照（CK）。根据次生物质对麦蚜的抗性阈值生测结果分别确定单宁酸、没食子酸和香豆素作为酶反应抑制剂的浓度。

1.4　几种酶活力测定方法

1.4.1　淀粉酶：取 0.2 mL 2%淀粉，0.2 mL 0.2 mol/L 磷酸缓冲液（PBS）（pH 6.0），0.2 mL 酶液，加 0.2 mL 抑制剂混匀，室温下反应 10 min 后，置于 37℃水浴 60 min，加 1 mL 3,5-二硝基水杨酸中止反应，然后沸水浴 5 min，于 550 nm 波长测吸光值。以无酶反应体系即用 0.2 mL　0.2 mol/L PBS（pH 6.0）代替酶液，作为对照；正常酶活力以 0.2 mL PBS 代替抑制剂。

1.4.2　蔗糖酶：取 0.2 mL 4%蔗糖，0.2 mL 0.2 mol/L PBS（pH 5.5），0.2 mL 酶液，加 0.2 mL 抑制剂混匀，室温下反应 10 min，置于 37℃水浴 60 min，加 1 mL 3,5 -二硝基水杨酸中止反应，然后沸水浴 5 min，于 550 nm 波长测吸光值。以无酶反应体系即用 0.2 mL 0.2 mol/L PBS pH 5.5 代替酶液，作为对照，正常酶活力以 0.2 mL PBS 代替抑制剂。

1.4.3　海藻糖酶：取 0.2 mL 3%海藻糖，0.2 mL 0.2 mol/L PBS（pH 5.5），0.2 mL 酶液，加 0.2 mL 抑制剂混匀，室温下反应 10 min，置 37℃水浴 60 min，加 1 mL 3,5-二硝基水杨酸中止反应，然后沸水浴 5 min，于 550 nm 波长测吸光值。无酶反应体系及正常酶活力反应体系同方法 1.4.2。

1.4.4　羧酸酯酶（CarE）：取 3.6 mL α-乙酸萘酯（α-NA），0.9 mL 抑制剂，0.1 mL 酶液混匀后，置 30℃水浴 15 min 后，加 1 mL DBLS 试剂（1%固蓝 B 与 5%十二烷基硫酸钠以 2∶5 混合），反应 15 min 后，于 600 nm 波长测吸光值。

注：α-乙酸萘酯：溶于丙酮中，配成 0.03 mol/L 贮液，使用前用 0.04 mol/L PBS 稀释至 3×10^{-4} mol/L；正常酶以 0.9 mL 0.04 mol/L PBS 代替抑制剂。

1.4.5　谷胱甘肽 S-转移酶：取 1.7 mL 0.1 mol/L PBS，1.0 mL 抑制剂，0.7 mL 30 mmol/L GSH，50 μL　0.1 mol/L　1-氯-2,4 -二硝基苯（CDNB）和 0.3 mL 酶液混匀后，在 25℃下反应 30 min，于 340 nm 波长测吸光值。

注：将 CDNB 溶于乙醇中配制成 0.1 mol/L 贮液；正常酶以 1 mL　0.1 mol/L PBS 代替抑制剂。

1.5　数据处理

以 ANOVA/MANOVA 统计方法统计分析数据，

并进行多重比较。

2 结果与分析

三种次生物质的不同浓度对麦长管蚜的存活、生长及发育的影响见表1。0.060%单宁酸、0.080%没食子酸、0.065%香豆素均能显著地降低蚜虫的存活率，抑制生长（若蚜增重）和发育（蜕皮指数）。将这三种次生物质的上述浓度定为抗麦长管蚜的阈值浓度，并以此作为酶活力测定试验的抑制剂浓度。

2.1 次生物质对麦长管蚜淀粉酶和糖转化酶活力的影响

蚜虫离体酶活力测定结果（表2）表明，单宁酸和没食子酸显著抑制蔗糖酶活力，但香豆素能刺激该酶活力；单宁酸和没食子酸显著抑制海藻糖酶活力；单宁酸和没食子酸对淀粉酶无明显的影响，香豆素还显著刺激该酶的活力。

2.2 次生物质对麦长管蚜解毒酶活力的影响

单宁酸和没食子酸显著抑制羧酸酯酶活力；三种次生物质极显著地抑制谷胱甘肽S-转移酶活力（表3）。

表1 人工饲料中阈值浓度次生物质对麦长管蚜的影响*

Table 1 Effects of threshold concentrations of secondary chemicals in the diet on nymphal *S. avenae* (Mean ± *SD*)*

次生物质 Secondary chemicals	存活率（%） Survival	蜕皮指数 Molt index	增重（mg） Weight gain
0.060%单宁酸 tannic acid	38.35 ± 16.27 c	1.41 ± 0.15 c	0.051 ± 0.012 b
0.080%没食子酸 gallic acid	75.14 ± 13.33 b	1.33 ± 1.10 c	0.046 ± 0.027 b
0.065%香豆素 coumarin	66.40 ± 7.12 b	2.05 ± 0.20 b	0.031 ± 0.006 b
对照 CK	94.06 ± 3.94 a	3.75 ± 0.17 a	0.195 ± 0.053 a

* a，b，c 表示在 Duncan 显著性测验中 $P < 0.05$ 水平下差异显著，相同字母表示差异不显著。蚜虫饲养在 22 ± 1℃，光周期为 12:12（L:D），适宜的湿度条件下进行

a，b，c indicated significant difference at $P < 0.05$ in Duncan's test，but the same letter showed no significance. The aphids were feed on diet at temperature of 22 ± 1℃，photoperiod of 12:12（L:D），and with suitable relative humidity

表2 次生物质对麦长管蚜淀粉酶、蔗糖酶和海藻糖酶活力的影响

Table 2 Effects of secondary chemicals on activity of amylase，invertase and trehalase in *S. avenae*

酶 Enzyme	底物 Substrate	蛋白含量 Content of protein（μg）	酶反应 Preincubation	酶比活力* Specific activity [OD/(mg·min)]	相对活性 Relative activity
淀粉酶 amylase	淀粉 starch	33.70	酶 enzyme（CK）	0.2747	1.00 b
			酶 + 单宁酸 enzyme + tannic acid	0.2010	0.73 b
			酶 + 没食子酸 enzyme + gallic acid	0.3000	1.09 b
			酶 + 香豆素 enzyme + coumarin	0.9430	3.43 a
蔗糖酶 invertase	蔗糖 sucrose	45.17	酶 enzyme（CK）	1.3320	1.000 b
			酶 + 单宁酸 enzyme + tannic acid	0.0813	0.060 c
			酶 + 没食子酸 enzyme + gallic acid	0.4240	0.318 d
			酶 + 香豆素 enzyme + coumarin	1.8880	1.417 a
海藻糖酶 trehalase	海藻糖 trehalose	45.17	酶 enzyme（CK）	1.543	1.000 b
			酶 + 单宁酸 enzyme + tannic acid	0.638	0.414 c
			酶 + 没食子酸 enzyme + gallic acid	1.460	0.946 b
			酶 + 香豆素 enzyme + coumarin	2.719	1.762 a

* 酶比活力为3次测定的平均值。显著性测定，小写字母及大写字母分别表示 $P < 0.05$ 及 $P < 0.01$ 显著水平，相同字母差异不显著。表3同

Specific activity was the mean of three measured values. Means followed by lower case or capital letters are significant at $P < 0.05$ or $P < 0.01$ respectively, those followed by the same letter are not significantly different. The same for the following table

表 3　次生物质对麦长管蚜二种解毒酶活力的影响

Table 3　Effects of secondary chemicals on activity of two detoxification enzymes in *S*. *avenae*

酶 Enzyme	底物 Substrate	蛋白含量 Content of protein (μg)	酶反应 Preincubation	酶比活性 Specific activity [OD/(mg·min)]	相对活性 Relative activity
羧酸酯酶 (CarE)	α-乙酸萘酯 (α-NA)	26.0	酶 enzyme (CK)	1.247	1.000 a
			酶 + 单宁酸 enzyme + tannic acid	0.263	0.211 b
			酶 + 没食子酸 enzyme + gallic acid	0.280	0.225 b
			酶 + 香豆素 enzyme + coumarin	1.263	1.010 a
谷胱甘肽 S-转移酶 (GST)	CDNB	32.7	酶 enzyme (CK)	0.930	1.000 aA
			酶 + 单宁酸 enzyme + tannic acid	0.125	0.134 dD
			酶 + 没食子酸 enzyme + gallic acid	0.488	0.525 bB
			酶 + 香豆素 enzyme + coumarin	0.187	0.201 cC

2.3　次生物质抗蚜机理分析

单宁酸不仅显著抑制蔗糖酶和海藻糖酶活力，影响蚜虫对糖的转化和能量利用；而且还强烈抑制羧酸酯酶（CarE）和谷胱甘肽 S-转移酶（GST）活力（图 1），使蚜虫的解毒能力下降，因而对麦蚜具有很强抗性作用。没食子酸显著抑制蔗糖酶活力。由于蔗糖是麦蚜的主要糖源，因而影响蚜虫对能源物质的转化和利用；它还显著地抑制 CarE 和 GST 活力（图 2）。因而没食子酸既可阻碍蚜虫对能量的利用，又能降低其解毒能力，是形成对麦蚜很强抗性的主要原因之一。香豆素对转化酶和 CarE 活力没有明显负作用，但极显著地抑制 GST 活力（图 3）。它对蚜虫的不良影响可能主要是使麦蚜解毒能力下降造成的。

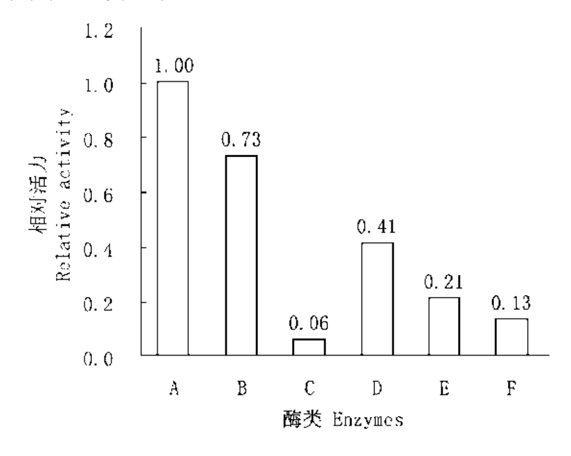


图 1　单宁酸对麦长管蚜五种酶相对活力的影响

Fig. 1　Relative effect of tannic acid on activity of five enzymes in *S*. *avenae*

A：对照 CK；B：淀粉酶 amylase；C：蔗糖酶 invertase；D：海藻糖酶 trehalase；E：羧酸酯酶 CarE；F：谷胱甘肽 S-转移酶 GST。图 2 与图 3 同此 The same for Fig. 2 and Fig. 3

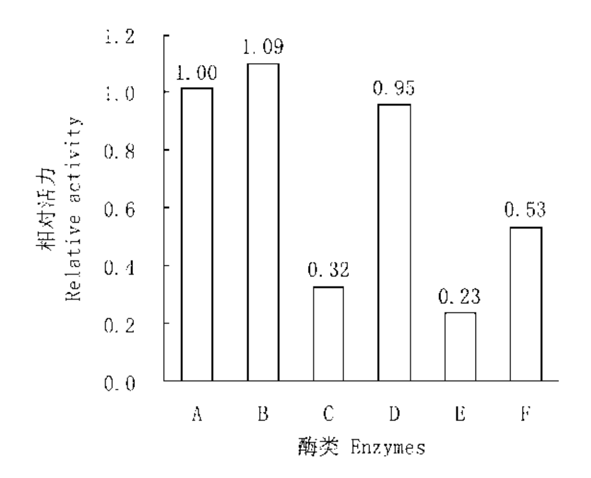


图 2　没食子酸对麦长管蚜五种酶相对活力的影响

Fig. 2　Relative effect of gallic acid on activity of five enzymes in *S*. *avenae*

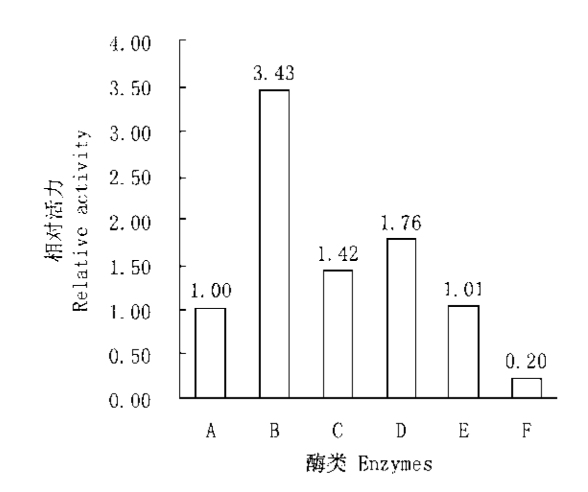


图 3　香豆素对麦长管蚜五种酶相对活力的影响

Fig. 3　Relative effect of coumarin on activity of five enzymes in *S*. *avenae*

3 讨论

我们的研究结果表明，小麦主要次生物质如单宁酸、没食子酸和香豆素等在阈值浓度下能显著影响麦长管蚜的生长发育和存活。生化测定表明，这些次生物质对蚜虫糖转化酶有不同的影响：单宁酸对蚜虫的蔗糖酶和海藻糖酶有很强的抑制作用，而香豆素对麦蚜的糖转化酶有刺激作用。武予清等（1996）的研究表明，单宁酸、香豆素对叶螨的蔗糖转化酶、淀粉转化酶和海藻糖酶活力均有抑制作用。香豆素对这两种刺吸式昆虫转化酶活力的作用差异悬殊，其原因还不清楚。没食子酸除了对蔗糖转化酶有显著抑制作用外，对其它两种转化酶的作用不明显。

Ishaaya 和 Swirski（1976）认为橄榄黑盔蚧 *Saissetia oleae* 体内的消化酶——蔗糖酶和海藻糖酶活力可以作为评价寄主拒食活性、取食刺激作用以及寄主适合度的指标。海藻糖酶在昆虫的能量供应中具有十分重要的作用，其活力可以作为它们对中碳水化合物能量转化的指标。单宁酸、没食子酸抑制麦长管蚜蔗糖酶和海藻糖酶活力，可能影响其对碳水化合物中能量的转化，从而对该蚜产生抗生性。

单宁酸、没食子酸和香豆素还明显抑制麦长管蚜 CarE 和 GST 的活力，降低蚜虫解毒能力，这也许是次生物质对该蚜抗生性另一原因。由上述研究结果推测，单宁酸和没食子酸对麦长管蚜存活、生长和发育的影响可能与其对蚜虫糖转化、利用效率和使其解毒能力下降有关；香豆素的抗蚜性可能与降低蚜虫的解毒酶活力有关。

昆虫解毒酶系统的类型可能与其特定的取食习性有关（Lindroth，1991）。麦蚜是吸食寄主植物韧皮部汁液的刺吸式害虫。Mullin（1986）认为蚜虫解毒酶系除了 GST 外，可能还有葡萄糖基转移酶参与，而多功能氧化酶（PSMOs）和环氧水解酶活性可能很低。刺吸式害虫对有毒物质比鞘翅目和鳞翅目昆虫更敏感（武予清等，1996）。对于麦长管蚜的葡萄糖基转移酶的活力、不同抗性品种以及用一种或多种抗蚜次生物质的人工饲料多代饲养诱导蚜虫活体解毒酶的变化规律等有待进一步研究。

参 考 文 献 （References）

Chen J L，Ding H J，Sun J R，Li X F，Ni H X，1997. The resistance patterns and mechanism of biochemical resistance in various wheat cultivars (or lines). *Acta Entomol. Sin.*，40 (Suppl.)：190－195.［陈巨莲，丁红建，孙京瑞，李晓飞，倪汉祥，1997. 主要抗蚜小麦品种（系）的抗性类型及其生化抗性机制. 昆虫学报，40（增刊）：190－195］

Chen J L，Ni H X，Ding H J，Sun J R，2000. Studies on a chemically defined diet of English grain aphid. *Scientia Agri. Sini.*，33 (3)：54－59.［陈巨莲，倪汉祥，丁红建，孙京瑞，2000. 麦长管蚜全纯人工饲料研制. 中国农业科学，33（3）：54－59］

Chen J L，Ni H X，Sun J R，2002. The resistance threshold and interactions of several plant secondary metabolites to wheat aphids. *Acta Phyto. Sin.*，19 (1)：7－12.［陈巨莲，倪汉祥，孙京瑞，2002. 主要次生物质对麦蚜的抗性阈值及交互作用. 植物保护学报，19（1）：7－12］

Ding H，Lamb J，Ames N，2000. Inducible production of phenolic acids in wheat and antibiotic resistance to *Sitodiplosis mosellana*. *J. Chem. Ecol.*，26 (4)：969－985.

Dreyer D L，Jones K C，Molyneux R J，1985. Feeding deterrency of some phrrolizidine，indolizidine and quinolizidine alkaloids towards pea aphid (*Acyrthosiphon pisum*) and evidence for phloem transport of indolizidine alkaloid swainsonine. *J. Chem. Ecol.*，11：1 045.

Ishaaya I，Swirski E，1976. Trehalase，invertase and amylase activities in the black scale，*Saissetia oleae*，and their relation to host adaptability. *J. Insect Physiol.*，22：1 025－1 029.

Leszczynski B，Dixon A F G，1992. Resistance of cereals to aphids：The interaction between hydroxamic acids and glutathine S-transferase in the grain aphid *Sitobion avenae* (F.) (Hom.，Aphididae). *J. Appl. Entomol.*，113：61－67.

Leszczynski B，Matok M，Dixon A F G，1994. Detoxification of cereals plant allelochemicals by aphids：activity and molecular weights of glutathine S-transferase in three species of cereal aphids. *J. Chem. Ecol.*，20 (2)：387－394.

Lindroth R L，1989. Host plant alteration of detoxication activity in *Papilio glaucus glaucus*. *Entomol. Exp. Appl.*，50：29－35.

Lindroth R L，1991. Differential toxicity of plant allelochemicals to insects：roles of enzymatic detoxication systems. In：Bernays E ed. Insect-Plant Interactions. Vol. Ⅲ. Florida：CRC Press，Inc.

Liu B C，Chen J L，Ni H X，Sun J R，2002. Isolation，purification and structural identification of DIMBOA and its resistance to English grain aphid，*Sitobion avenae* (F). *Chinese J. Appl. Environ. Biol.*，8 (1)：71－74.［刘保川，陈巨莲，倪汉祥，孙京瑞，2002. 丁布的分离、纯化和结构鉴定及其对麦长管蚜生长发育的影响. 应用与环境生物学报，8（1）：71－74］

Luo W C，Mu W，1998. The effects of activity of two esterases on insect after treated with cytosine and aloperine. *J. Shandong Agri. Univ.*，29 (1)：1－7.［罗万春，慕卫，1998. 金雀花碱等对小菜蛾幼虫体内羧酸酯酶等水解酶活性的影响. 山东农业大学学报，29（1）：1－7］

Mentink P J M，Kimmins F M，Harrewijn P，Dieleman F L，Tjallingii W F，Van Rheenen B，Eenink A H，1984. Electrical penetration graphs combined with stylet cutting in the study of host plant resistance to aphids. *Entomol. Exp. Appl.*，36：210.

Molyneux R J，Campbell B C，Dreyer D L，1990. Honeydew analysis for detecting phloem transport of plant natural products，implications for host plant resistance to sap sucking insect. *J. Chem. Ecol.*，16：1 899.

Mullin C A，1986. Adaptive divergence of chewing and sucking arthropods to plant allelochemicals. In：Brattsten L B，Ahmand S eds. Molecular Aspects of Insect-Plant Associations. New York：Plenum Press. 346.

Raul L M，Figueroa C C，Niemeyer H M，2000. Effect of wheat cultivars differing in hydroxamic acid concentration on detoxification metabolism in the aphids *Sitobion avenae*. *J. Chem. Ecol.*，26（12）：2 725－2 736.

Raven J A，1983. Phytophages of xylem and phloem，a comparison of animal and plant sap feeder. *Adv. Ecol. Res.*，13：136.

Waller G R，1987. Allelochemicals：Role in Agriculture and Forestry. American Chemical Society，Washington，D C Press.

Wu Y Q，Liu Q X，Gao Z R，Zhong C Z，1996. A study on resistance mechanism in cotton cultivar to *Tetranychus cinnabarinus*. *Scientia Agri. Sin.*，29（3）：1－7.［武予清，刘芹轩，高宗仁，钟昌珍，1996. 棉花品种的抗螨机制研究. 中国农业科学，29（3）：1－7］

Zhang K，Yang E B，Tang W Y，Wong K P，Mack P，1997. Inhibition of glutathione reductase by plant polyphenols. *Biochem. Pharmacol.*，（9）：1 047－1 053.